

بررسی ویژگی های مارکر D7S496 در پنج قوم ایرانی به منظور آنالیز پیوستگی ناشنوایی غیر سندرمیک

مرجان مجتبی نائینی^۱، صادق ولیان بروجنی^۲، مرتضی هاشم‌زاده چالشتی^{۳*}

^۱ مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ ^۲ گروه زیست‌شناسی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران.

تاریخ پذیرش: ۹۲/۴/۲۵

تاریخ دریافت: ۹۲/۱/۲۱

چکیده:

زمینه و هدف: مهم ترین عامل ژنتیکی ایجاد کننده ناشنوایی غیر سندرمیک با وراثت اتوزومی مغلوب پس از ژن GJB2، جهش‌های ژن SLC26A4 هستند که امروزه در تشخیص‌های مولکولی مورد بررسی قرار می‌گیرند. در این مطالعه، خصوصیات و اطلاع دهنده‌گی مارکر D7S496 با توالی‌های تکراری CA، که در ناحیه ۵ ژن SLC26A4 حضور دارد، در پنج قوم مختلف جمعیت ایرانی مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی: در این مطالعه بنیادی - کاربردی، ژنوتیپ جایگاه ژنی مارکر D7S496 در ۱۶۵ فرد شنوای غیر خویشاوند از پنج قوم فارس، آذری، ترکمن، گیلک و عرب توسط PCR و سپس ژل الکتروفورز پلی اکریل آمید و در نهایت الکتروفورز فلورسنت موئینه تعیین شد. به منظور تحلیل نتایج از نرم افزارهای GeneMarker HID Human STR Identity، GenePop و Microsatellite Tools استفاده شد.

یافته‌ها: بررسی آلل‌های مارکر D7S496 نشان‌دهنده وجود ۱۰ آلل در جمعیت ایرانی است که آلل ۱۳۷ جفت باز با فراوانی ۴۱/۵۲٪ در جمعیت ایرانی فراوان ترین آلل به شمار می‌آید. هتروزیگوسیتی مشاهده شده در کلیه اقوام، تقریباً بالای ۷۰٪ است، که از میان آن‌ها بالاترین هتروزیگوسیتی متعلق به قوم ترکمن به میزان ۸۱/۸٪ می‌باشد. در انتها، بررسی مقدار PIC مارکر حاکی از اطلاع دهنده‌گی شدید (Highly Informative) آن در اقوام مورد بررسی جمعیت ایرانی می‌باشد (مقدار PIC بالاتر از ۰/۷).

نتیجه‌گیری: نتایج به دست آمده در این مطالعه مارکر D7S496 را به شدت اطلاع دهنده در تشخیص‌های مولکولی ناشنوایی غیر سندرمیک وابسته به SLC26A4 با توارث اتوزومی مغلوب به روش آنالیز پیوستگی در جمعیت ایرانی معرفی می‌نماید.

واژه‌های کلیدی: توالی تکراری پشت سر هم، SLC26A4، ناشنوایی غیر سندرمیک اتوزومی مغلوب، جمعیت ایرانی.

مقدمه:

می‌شوند و با توجه به الگوی وراثتی به چهار دسته اتوزومی غالب (DFNA)، اتوزومی مغلوب (DFNB)، وابسته به (DFN) و میتوکندریایی (DFNM) تقسیم‌بندی می‌گردند (۳). ناشنوایی با وراثت اتوزومی مغلوب (Autosomal recessive non-syndromic hearing loss= ARNSHL) با فراوانی ۷۵-۸۰ درصد، از میان چهار گروه دارای بیش‌ترین فراوانی می‌باشد (۴). در بسیاری از جمعیت‌های جهان از جمله جمعیت ایرانی شایع ترین جهش‌های مسئول ناشنوایی غیر سندرمیک با وراثت اتوزومی مغلوب جهش‌های ژن GJB2 و پس از آن ژن SLC26A4 هستند (۵، ۶).

متداول ترین نقص حسی در انسان ناشنوایی مادرزادی است که شیوع آن ۱ در ۱۰۰۰ نوزاد می‌باشد (۱). عوامل مختلفی در ایجاد ناشنوایی مادرزادی دخیل هستند که بیش از ۵۰ درصد موارد، وراثتی می‌باشند (۲). ناشنوایی وراثتی به دو دسته سندرمیک و غیر سندرمیک گروه‌بندی می‌شود. نوع غیر سندرمیک (Non-syndromic hearing loss= NSHL) ۷۰ درصد و نوع سندرمیک (Syndromic hearing loss= SHL) ۳۰ درصد کل ناشنوایی های وراثتی را تشکیل می‌دهند. ناشنوایی غیر سندرمیک براساس سن آغاز پیش گفتاری (Prelingual) و پس گفتاری (Postlingual) خوانده

هتروژنی بالا و نقش کم بسیاری از ژن های ایجاد کننده ناشنایی، موجب شده که غربالگری کامل جهش ها در تشخیص های مولکولی امکان پذیر نباشد و در بسیاری از نقاط جهان، غربالگری تنها برای جهش های دو ژن GJB2 و SLC26A4 در تشخیص های مولکولی صورت می گیرد (۵). تشخیص مولکولی ناشنایی بر پایه دو روش بررسی مستقیم جهش و بررسی غیر مستقیم به روش آنالیز پیوستگی انجام می گردد. روش انتخابی در تشخیص های مولکولی به ویژگی های ژن مورد بررسی بستگی دارد که اولویت آن ها در ژن های مختلف متفاوت است (۷). در بررسی مستقیم می توان به تعیین توالی ژنوم بیماران برای تشخیص جهش های ایجاد کننده بیماری اشاره کرد که برای جهش های ژن GJB2 به علت وسعت کم ژن، و شیوع بالای جهش 35delG از میان جهش ها مناسب به نظر می آید (۸). در حالی که وسعت زیاد ژن SLC26A4 و پراکندگی جهش های مشاهده شده در جمعیت ایرانی در نواحی مختلف ژن و نیز شیوع تقریباً یکسان این جهش ها، موجب آن شده که روش مستقیم یک روش ایده آل برای بررسی جهش های این ژن نباشد و به منظور صرفه جویی در وقت و هزینه بهتر است از روش غیرمستقیم استفاده گردد (۹).

بررسی غیر مستقیم جهش ها یا آنالیز پیوستگی توسط مارکرهای چندشکلی متصل به ژن صورت می گیرد. از جمله مارکرهای مورد استفاده در بررسی غیر مستقیم، توالی های تکراری پشت سر هم (STR= Short tandem repeat) می باشند که از دسته ریزماهواره های موجود در ژنوم هستند و به مقدار بسیار زیاد و تصادفی در طول ژنوم پراکنده می باشند (۱۰). تغییر در تعداد واحدهای توالی کوتاه ۲ تا ۴ نوکلئوتیدی که پشت سرهم تکرار شده است چند شکلی های STR را ایجاد می نماید. استفاده از مارکرهای اطلاع دهنده در آنالیز پیوستگی موجب افزایش کیفیت تشخیصی می گردد. اطلاع دهنده گی یک مارکر توسط فاکتور ظرفیت اطلاعاتی چند شکلی (Polymorphism Information Content= PIC)

اندازه گیری می شود. مقدار PIC برای جایگاه های ژنی در تعادل هاردی وینبرگ در جمعیت تعریف می شود که به تعداد آلل ها و هتروزیگوسیتی مارکر بستگی دارد و بنابراین در جمعیت های مختلف به دلیل ساختارهای ژنتیکی متفاوت متغیر می باشد (۱۱، ۱۲). در نتیجه به منظور غربالگری بهینه جهش ها به روش غیر مستقیم، مارکرهای مورد استفاده بایستی در جمعیت های مختلف ارزیابی شوند و مارکرهای اطلاع دهنده هر جمعیت به طور جداگانه معرفی گردند.

تاکنون هیچ مطالعه ای مبنی بر بررسی مارکرهای اطلاع دهنده مرتبط با ژن SLC26A4 در جمعیت ایرانی صورت نگرفته است و مطالعات خارجی در این زمینه نیز بسیار محدود می باشد. در پایگاه داده ها مارکرهای مختلفی در ناحیه ژن SLC26A4 معرفی شده است. یکی از مارکرهای پیوسته به ژن SLC26A4، D7S496 است که در ناحیه ۵ این ژن قرار دارد. گزارشات پایگاه داده ها حاکی از هتروزیگوسیتی بالای مارکر D7S496 در سایر جمعیت ها است، به همین علت این مارکر به منظور بررسی در جمعیت ایرانی انتخاب شد (۱۳، ۱۴). در این مطالعه خصوصیات و اطلاع دهنده گی این مارکر در پنج قوم جمعیت ایرانی مورد بررسی و مقایسه قرار گرفته است که نتایج آن می تواند موجب بهینه سازی تشخیص های مولکولی ناشنایی های وابسته به ژن SLC26A4 و همچنین تقویت اطلاعات ساختاری ژنتیکی جمعیت ایرانی گردد.

روش بررسی:

در این مطالعه بنیادی-کاربردی، از تعداد ۱۶۵ فرد شنوای غیر خویشاوند از پنج قوم مختلف ایرانی شامل فارس، آذری، ترکمن، گیلک و عرب (از هر قوم ۳۳ فرد) با میزان تقریباً برابر از خانم ها و آقایان نمونه گیری به عمل آمد. پس از کسب رضایت نامه کتبی، با روش نمونه گیری آسان ۱۰ میلی لیتر از خون تام فرد را در لوله حاوی یک میلی لیتر از

تکنیک الکتروفورز موئینه رنگ فلورسنت HEX (رنگ سبز) افزوده شد که توسط دستگاه ABI Prism 3130 خوانده شد و در نهایت نتایج به صورت نمودار نمایش داده شد. نمودارهای به دست آمده توسط نرم افزار GeneMarker HID Human STR تعیین ژنوتیپ و آلل بندی شدند.

آنالیز آماری نتایج به دست آمده از تعیین ژنوتیپ افراد شامل تخمین فراوانی آللی، درجه هتروزیگوسیتی و فراوانی ژنوتیپی مشاهده شده و مورد انتظار فنوتیپ های هموزیگوت و هتروزیگوت و هم چنین بررسی تعادل هاردی وینبرگ (Hardy-Weinberg equilibrium, HWE) با استفاده از نرم افزار پایگاه GenePop انجام شد (۱۶). روش هایی که تاکنون برای بررسی تعادل هاردی وینبرگ استفاده شده است در دو گروه قرار می گیرند. روش اول استفاده از آزمون χ^2 است. این آزمون وقتی که اندازه نمونه کوچک باشد و یا آلل های نادر وجود داشته باشد قابل اعتماد نیست. روش دیگر بر اساس آزمون دقیق فیشر است. آزمون فیشر وقتی که آلل های نادر وجود دارد مناسب هستند و بنابراین بایستی برای مارکرهایی که تعداد زیاد آلل دارند همانند لوکوس های ریزماهواره استفاده شود (۱۷، ۱۸). این نرم افزار با استفاده از آزمون دقیق فیشر به بررسی تعادل می پردازد.

در نهایت با استفاده از نرم افزار Microsatellite Tools میزان PIC را تخمین زده و به بررسی اطلاع دهنده گی مارکر در اقوام مختلف پرداخته ایم (۱۹).

یافته ها:

محصول PCR نمونه های افراد شنوای غیر خویشاوند برای مارکر D7S496 ابتدا با روش الکتروفورز بر روی ژل پلی اکریل آمید ۸٪ مورد مشاهده و ارزیابی قرار گرفتند و پس از اطمینان از وجود محصولات PCR مناسب با استفاده از فلورسنت الکتروفورز موئینه تعیین ژنوتیپ و آلل بندی شدند. این

(Ethylenediamine tetra acetic Acid= EDTA) با غلظت ۰/۵ M جمع آوری و پس از ثبت اطلاعات افراد بر روی آن تا زمان آزمایش در ۲۰°C- نگهداری شد. DNA نمونه های خون به روش استاندارد فل- کلروفرم استخراج گردید و کمیت حاصله با استفاده از دستگاه (Isogen, Rockland/Montchanin, USA) 1000 NanoDrop مورد بررسی قرار گرفت. کلیه مارکرهای STR ناحیه ژن SLC26A4 موجود در پایگاه داده UniSTS بررسی شدند و در نهایت مارکر D7S496 (UniSTS:2401) به منظور مطالعه بیش تر به علت هتروزیگوسیتی بالای گزارش شده در پایگاه داده هایی از جمله center Genethon انتخاب گردید (۱۴). پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق، از تحقیقات پیشین و پایگاه داده UniSTS در سایت NCBI استخراج شد. توالی پرایمر پیشرو (Forward, F) و پرایمر پیرو (Reverse, R) به صورت زیر می باشد که با انجام واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) قطعاتی با طول متغیر ۱۴۱-۱۲۹ جفت باز تولید می نماید (۱۵).

F: 5'-AACAAACAGTCAACCCACAAT-3'
R: 5'-GCTATAACCTCATAANAAACCAAAA-3'

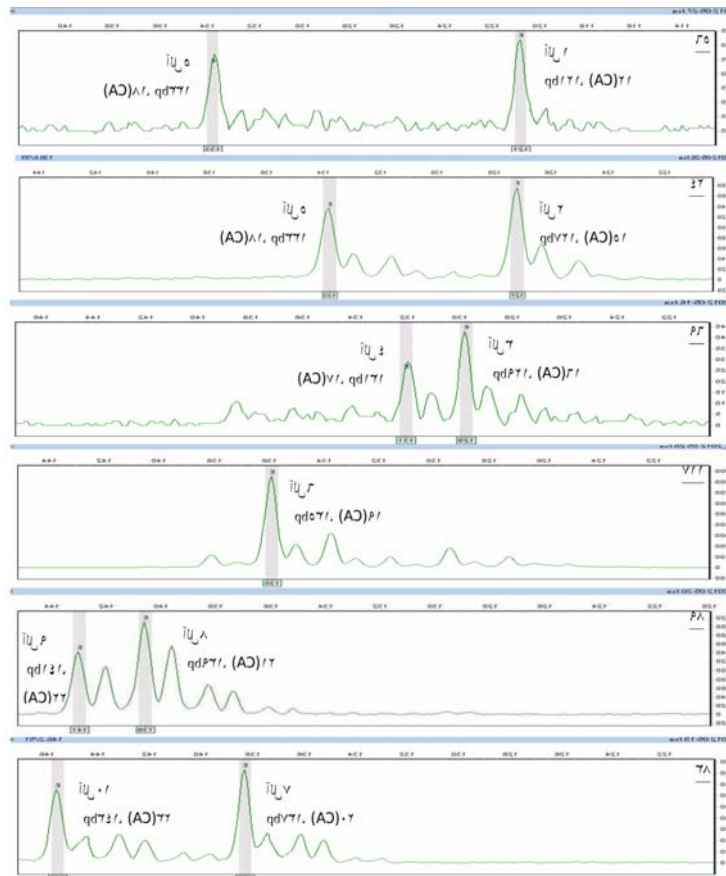
انجام PCR بر روی نمونه های DNA با استفاده

از دستگاه ترموسایکلر (ASTEC PC818-Japan) با برنامه تاج داوون (Touch Down) طبق جدول شماره ۱ انجام شد. شرایط واکنش PCR شامل: ۱μl از دو پرایمر (10Pm)، ۱μl از Taq DNA Polymerase (5U/μl)، 0.5μl از dNTP mix (10mM)، 2.5μl از TaqDNAbuffer (10X)، ۱μl از MgCl2 (50mM) و 2μl از DNA (80ng) که با ddH2O به حجم 25μl رسانیده شد.

کلیه محصولات بر روی ژل پلی اکریل آمید ۸ درصد (نسبت ۱ بیس اکریل آمید: ۱۹ اکریل آمید) به مدت سه ساعت با ولتاژ ۲۰۰ ولت رانده شد و ژل به دست آمده با نیترا ت نقره رنگ آمیزی گردید. پس از تأیید کیفیت باندها محصولات توسط الکتروفورز موئینه فلورسنت مورد بررسی قرار گرفتند. در سر ۵ پرایمر پیرو، به منظور تعیین طول محصولات PCR توسط

تمامی آلل ها قوم فارس ۶ آلل، آذری ۸ آلل، ترکمن ۸ آلل، گیلک ۸ آلل و عرب ۶ آلل را دارا بودند که در جدول شماره ۲ فراوانی آلل ها به طور جداگانه در هر قوم و به طور کلی در جمعیت ایرانی بیان شده است.

آلل بندی ها به دو صورت تعداد جفت باز طول محصولات و تعداد تکرارهای CA بیان شده است. نتایج حاصل نشان دهنده حضور مجموع ۱۰ آلل به طور کلی در جمعیت ایرانی است (تصویر شماره ۱). از میان



تصویر شماره ۱: تعیین تعداد آلل های مارکر D7S496.

نمونه های ۱۹، ۲۹، ۵۶ و ۱۳ هتروزیگوت و نمونه ۱۱۷ هموزیگوت می باشند. در این ۶ نمونه ۱۰ آلل مشاهده شده در کلیه نمونه ها نشان داده شده است.

جدول شماره ۱: برنامه بهینه شده نهایی دستگاه ترموسایکلر برای مارکر D7S496

مرحله	دما (°C)	مدت	تعداد سیکل
۱	۹۴	۳ دقیقه	۱
۲	۹۴	۳۰ ثانیه	۱۰ سیکل تاج داوون
	۶۰ الی ۵۱	۳۰ ثانیه (کم شدن یک درجه در هر سیکل)	
	۷۲	۳۰ ثانیه	
۳	۹۴	۳۰ ثانیه	۲۵ سیکل معمولی
	۵۰	۳۰ ثانیه	
	۷۲	۳۰ ثانیه	
۴	۷۲	۷ دقیقه	۱

جدول شماره ۲: آلل‌ها و درصد فراوانی‌های آللی مارکر D7S496 در اقوام مختلف ایرانی

قوم	شماره	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰
آلل		۱۲۱	۱۲۷	۱۲۹	۱۳۱	۱۳۳	۱۳۵	۱۳۷	۱۳۹	۱۴۱	۱۴۳
		CA۱۸	CA۲۰	CA۲۱	CA۲۲	CA۲۳	CA۲۴	CA۲۵	CA۲۶	CA۲۷	CA۲۸
کلید اقوام (جمعیت ایرانی)	فراوانی آللی (%)	۰/۳	۰/۳	۱۵/۱۵	۳/۹۴	۱۶/۳۶	۱۰/۶۱	۴۱/۵۲	۶/۹۷	۳/۹۴	۰/۹۱
فارس				۲۵/۷۶	۳/۰۳	۱۰/۶۱	۱۵/۱۵	۳۷/۸۸	۷/۵۸		
آذری		۱/۵۲		۱۳/۶۴	۱۲/۱۲	۲۱/۲۱	۹/۰۹	۳۶/۳۶	۴/۵۵	۱/۵۲	
ترکمن				۷/۵۸	۳/۰۳	۱۲/۱۲	۱۰/۶۱	۴۰/۹۱	۹/۰۹	۱۳/۶۴	۳/۰۳
گیلک				۶/۰۶	۱/۵۲	۱۲/۱۲	۱۰/۶۱	۵۱/۵۲	۱۲/۱۲	۴/۵۵	۱/۵۲
عرب		۱/۵۲	۲۲/۷۳			۲۵/۷۶	۷/۵۸	۴۰/۹۱	۱/۵۲		

CA: تعداد تکرار توالی CA.

پس از تعیین ژنوتیپ افراد، درصد هتروزیگوسیتی و هموزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار برای هر یک از قوم‌ها به صورت جداگانه و در نهایت برای جمعیت ایرانی توسط نرم افزار GenePop محاسبه شد که به تفصیل در جدول شماره ۳ نشان داده شده است.

جدول شماره ۳: درصد هتروزیگوسیتی و هموزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار مارکر D7S496 با استفاده از پایگاه اینترنتی GenePop

قوم	هتروزیگوسیتی مشاهده شده (%)	هتروزیگوسیتی مورد انتظار (%)	هموزیگوسیتی مشاهده شده (%)	هموزیگوسیتی مورد انتظار (%)
کلید اقوام (جمعیت ایرانی)	۷۴/۵	۷۶/۱	۲۵/۵	۲۳/۹
فارس	۷۸/۸	۷۶/۱	۲۱/۲	۲۳/۹
آذری	۷۲/۷	۷۱/۹	۲۷/۳	۲۸/۱
ترکمن	۸۱/۸	۷۸/۴	۱۸/۲	۲۱/۶
گیلک	۶۹/۷	۶۹/۸	۳۰/۳	۳۰/۲
عرب	۶۹/۷	۷۱/۹	۳۰/۳	۲۸/۱

در انتها، به دلیل حضور جایگاه ژنی مارکر در چهار قوم آذری، ترکمن، گیلک و عرب در تعادل هاردی وینبرگ، مقدار PIC توسط نرم‌افزار Microsatellite Tools، با توجه به اطلاعات به دست آمده از فراوانی آلل‌ها و هتروزیگوسیتی مشاهده شده، در این چهار قوم به طور جداگانه محاسبه شد (جدول شماره ۴). قوم فارس برای این مارکر در تعادل هاردی وینبرگ نمی‌باشد، در نتیجه مقدار PIC محاسبه شده

تعادل هاردی وینبرگ بیان می‌کند که در جمعیتی با جفت‌گیری تصادفی بدون انتخاب، جهش، یا مهاجرت فراوانی‌های آللی و فراوانی‌های ژنوتیپی از نسلی به نسل دیگر ثابت هستند. در این مطالعه تعادل هاردی وینبرگ برای جایگاه مارکر در قوم‌های مختلف و همچنین به طور کلی جمعیت ایرانی توسط نرم‌افزار GenePop بررسی شد که نتایج به دست آمده در جدول شماره ۴ نشان داده شده است.

برای آن معتبر نخواهد بود و برای بررسی اطلاع دهنده گی مارکر در این قوم از مقدار PIC به دست آمده برای جمعیت ایرانی که اطلاعات ژنوتیپی این قوم نیز در آن دخیل است استفاده می گردد.

جدول شماره ۴: تعادل هاردی وینبرگ و مقدار PIC مارکر D7S496 در جمعیت ایرانی و اقوام مختلف آن

قوم	P	PIC
کلیه اقوام (جمعیت ایرانی)	۰/۳۳۲۵	۰/۷۳۱
فارس	۰/۰۲۰۴	-
آذری	۰/۲۸۲۲	۰/۷۵۰
ترکمن	۰/۸۱۶۶	۰/۷۴۹
گیلک	۰/۶۹۵۷	۰/۶۶۱
عرب	۰/۱۲۳۰	۰/۶۵۹

بحث:

این مطالعه به منظور شفاف سازی ویژگی ها و خصوصیات مارکر D7S496 در جمعیت ایرانی و در اقوام مختلف آن صورت گرفته است که خود به انتخاب بهینه مارکرهای مورد استفاده در تشخیص مولکولی جهش های SLC26A4 مسئول ناشنوایی به روش غیر مستقیم کمک می نماید و در پیشرفت روش های تشخیصی جمعیت ایرانی موثر می باشد. همچنین نتایج این مطالعه موجب تقویت اطلاعات ساختاری ژنتیکی جمعیت ایرانی و اقوام مختلف آن می گردد.

در مطالعه ی حاضر بر روی مارکر D7S496 از میان ۱۰ آلل شناسایی شده، آلل ۷ با طول محصول PCR ۱۳۷ جفت باز (برای اطلاع از تعداد تکرار توالی CA در هر آلل به جدول شماره ۲ رجوع شود) و درصد فراوانی ۴۱/۵۲٪ بیش ترین فراوانی و آلل ۱ و ۲ با طول محصول PCR ۱۲۱ و ۱۲۷ جفت باز و درصد فراوانی ۰/۳٪ کم ترین فراوانی را در جمعیت ایرانی نشان دادند (جدول شماره ۲). براساس اطلاعات پایگاه داده UniSTS (2401:UniSTS) آلل های این مارکر دارای محدوده محصول PCR ۱۴۱-۱۲۹ جفت باز می باشند. نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان می دهد که علاوه به آلل های گزارش

شده در پایگاه داده UniSTS، آلل هایی با طول محصول PCR ۱۴۳، ۱۲۷ و ۱۲۱ جفت باز نیز در جمعیت ایرانی وجود دارند که به دلیل فراوانی کم تر از ۱ درصد آنها، به عنوان واریانت های نادر جدید معرفی می شوند.

در قوم فارس از میان ۱۰ آلل مشاهده شده در جمعیت ایرانی، ۶ آلل وجود داشت که از میان آنها آلل های ۱۲۱، ۱۲۷، ۱۴۱ و ۱۴۳ جفت بازی دیده نشدند. در این قوم نیز آلل ۱۳۷ جفت باز با درصد فراوانی ۳۷/۸۸٪ شایع ترین و آلل ۱۳۱ با درصد فراوانی ۳/۰۳٪ کمیاب ترین آلل ها بودند (جدول شماره ۲). قوم آذری از ۱۰ آلل جمعیت ایرانی ۸ آلل را دارا بود که از میان آنها آلل ۱۳۷ جفت باز با درصد فراوانی ۳۶/۳۶٪ و آلل های ۱۲۱ و ۱۴۱ جفت بازی با درصد فراوانی ۱/۵۲٪ به ترتیب بیش ترین و کم ترین فراوانی را از خود نشان دادند. دو آلل ۱۲۷ و ۱۴۳ جفت بازی در قوم آذری مشاهده نشد (جدول شماره ۲). بررسی های انجام شده بر روی افراد قوم ترکمن نشان دهنده حضور ۸ آلل از مارکر D7S496 در این قوم می باشد. در قوم ترکمن نیز آلل ۱۳۷ جفت باز با درصد فراوانی ۴۰/۹۱٪ شایع ترین و آلل های ۱۳۱ و ۱۴۳ جفت باز با درصد فراوانی ۳/۰۳٪

کمیاب‌ترین آلل‌های این قوم به حساب می‌آیند. بررسی ژنوتیپ‌های افراد این قوم حاکی از عدم حضور آلل‌های ۱۲۱ و ۱۲۷ جفت بازی بود. گیلکی‌ها نیز ۸ آلل از مارکر مورد بررسی را دارا بودند که مشابه با اقوام قبلی فراوان‌ترین آلل، آلل ۱۳۷ جفت باز با درصد فراوانی ۵۱/۵۲٪ بود. هم‌چنین دو آلل ۱۳۱ و ۱۴۳ جفت باز با درصد فراوانی ۱/۵۲٪ کم‌ترین درصد فراوانی را در این قوم داشتند. آلل‌های ۱۲۱ و ۱۲۷ جفت باز در این قوم مشاهده نشد. در انتها، در قوم عرب از میان ۶ آلل مشاهده شده جمعیت ایرانی آلل ۱۳۷ جفت باز با درصد فراوانی ۴۰/۹۱٪ شایع‌ترین آلل می‌باشد، در حالی که آلل‌های ۱۲۷ و ۱۳۹ جفت باز با درصد فراوانی ۱/۵۲٪ کمیاب‌ترین‌ها به شمار می‌آیند. آلل‌های ۱۲۱، ۱۳۱، ۱۴۱ و ۱۴۳ جفت بازی جمعیت ایرانی در قوم عرب دیده نشد. همان‌طور که بررسی‌ها نشان می‌دهد این مارکر در اقوام مختلف دارای بیش از ۶ آلل می‌باشند.

درصد هتروزیگوسیتی و هموزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار اقوام مورد بررسی و به طور کلی جمعیت ایرانی در جدول شماره ۳ گزارش شده است. درصد هتروزیگوسیتی مشاهده شده برای مارکر D7S496 در جمعیت ایرانی ۷۴/۵٪ است که کمی کمتر از درصد هتروزیگوسیتی مورد انتظار (۷۶/۱٪) می‌باشد. درصد هتروزیگوسیتی گزارش شده برای مارکر D7S496 توسط Mammalian Genotyping Service ۷۴٪ می‌باشد که تقریباً مشابه با درصد هتروزیگوسیتی به دست آمده برای جمعیت ایرانی در این مطالعه است (۱۴،۱۳). بالاترین درصد هتروزیگوسیتی مشاهده شده متعلق به قوم ترکمن (۸۱/۸٪) و پایین‌ترین متعلق به اقوام گیلک و عرب (۶۹/۷٪) بودند. یکی از مهم‌ترین دلایل پایین بودن درصد هتروزیگوسیتی تمایل افراد به درون زادآوری قومی است که خود منجر به افزایش هموزیگوسیتی و کاهش هتروزیگوسیتی می‌گردد.

پس از تخمین فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی داده‌ها، وجود تعادل هاردی وینبرگ مورد بررسی قرار گرفت. تعادل هاردی وینبرگ بیان می‌کند که در جمعیتی با جفت‌گیری تصادفی بدون انتخاب، جهش، یا مهاجرت فراوانی‌های آللی و فراوانی‌های ژنوتیپی از نسلی به نسل دیگر ثابت هستند (۲۰). در این مطالعه به منظور بررسی تعادل هاردی وینبرگ از نرم‌افزار GenePop استفاده شده است. فرض صفر در این آزمون مبنی بر حضور تعادل هاردی وینبرگ در اقوام و جمعیت مورد بررسی است. در صورتی که مقدار P کوچک‌تر از ۰/۰۵ بدست آید فرضیه صفر مبنی بر وجود تعادل هاردی وینبرگ رد می‌شود. علت انحراف از تعادل هاردی وینبرگ می‌تواند به دلیل فاکتورهای ژنتیک جمعیت مانند درون‌زایی و یا مهاجرت باشد (۲۱). نتایج به دست آمده از بررسی تعادل هاردی وینبرگ در جدول شماره ۴ گزارش شده است. مقدار P محاسبه شده برای چهار قوم آذری، ترکمن گیلک و عرب مورد بررسی بزرگ‌تر از ۰/۰۵ هستند و در نتیجه این اقوام برای جایگاه مارکر مورد بررسی در تعادل هاردی وینبرگ می‌باشند. در حالی که مقدار P برای قوم فارس کمتر از ۰/۰۵ می‌باشد و در نتیجه این قوم برای جایگاه مارکر D7S496 در تعادل هاردی وینبرگ نمی‌باشد.

فاکتور ظرفیت اطلاعاتی چند شکلی (PIC) یک فاکتور محاسباتی برای تعیین اطلاع‌دهندگی مارکرها به منظور استفاده در آنالیز پیوستگی می‌باشد. این فاکتور برای جایگاه مارکرهای دارای تعادل هاردی وینبرگ در جمعیت تعریف می‌شود که به تعداد و فراوانی آلل‌ها و هتروزیگوسیتی مشاهده شده در جمعیت وابسته است. مقدار PIC بالاتر از ۰/۷ نشان دهنده اطلاع دهنده‌گی شدید (Highly Informative) مارکر در آنالیز پیوستگی برای ژن متصل به آن است. هنگامی که مقدار آن مابین ۰/۴۴ و ۰/۷ باشد، مارکر از اطلاع دهنده‌گی متوسط (Moderately Informative) برخوردار است و اگر کمتر از ۰/۴۴ باشد، مارکر

مارکر D7S496 برای قوم فارس نیز به شدت اطلاع دهنده می باشد.

نتیجه گیری:

این مطالعه نشان می دهد که مارکر D7S496 که در سمت ۵ ژن SLC26A4 واقع شده است و به آن متصل می باشد دارای اطلاع دهنده شدید در تشخیص های مولکولی ناشنایی غیرسندرمیک وابسته به SLC26A4 با توارث اتوزومی مغلوب به روش آنالیز پیوستگی در جمعیت ایرانی می باشد و از آن می توان برای در غربالگری جهش ها به روش غیر مستقیم بهره برد.

تشکر و قدردانی:

بدینوسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد جهت تأمین بودجه (شماره گرانت ۱۰۴۵) و از کلیه کارکنان محترم مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی شهرکرد هم چنین تمام افرادی که در دادن نمونه ما را یاری نموده اند تشکر و قدردانی می گردد. قابل ذکر است که این مقاله منتج از پایان نامه می باشد.

اطلاع دهنده ای ضعیف به شمار می آید (۱۲). در این مطالعه مقدار PIC تنها برای چهار قوم در تعادل دارای اعتبار می باشد و نمی توان مقدار PIC قوم فارس را تحلیل نمود. در نتیجه مقدار PIC محاسبه شده برای جمعیت ایرانی را به قوم فارس نیز تعمیم می دهیم. مقدار PIC برای دو قوم گیلک و عرب مابین ۰/۴۴ و ۰/۷ می باشد و در نتیجه این مارکر برای دو قوم مزبور دارای اطلاع دهنده ای متوسط (Moderately Informative) می باشد. در حالی که مقدار PIC دو قوم ترک، ترکمن بالاتر از ۰/۷ است و بنابراین مارکر D7S496 برای این دو قوم دارای اطلاع دهنده ای شدید (Highly Informative) می باشد. مقدار PIC کلیه اقوام جمعیت ایرانی (PIC=۰/۷۳۱) بالاتر از ۰/۷ است و در نتیجه می توان در مجموع این مارکر را برای جمعیت ایرانی یک مارکر با اطلاع دهنده ای شدید برای بررسی جهش های ژن SLC26A4 به روش آنالیز پیوستگی دانست. به دلیل اینکه قوم فارس به تنهایی در تعادل هاردی وینبرگ نبود، با توجه به مقدار PIC جمعیت ایرانی که اطلاعات ژنوتیپی افراد قوم فارس نیز در محاسبات دخالت داده شده است، نتیجه می گیریم که

منابع:

1. Marazita ML, Ploughman LM, Rawlings B, Remington E, Arnos KS, Nance WE. Genetic epidemiological studies of early-onset deafness in the US school-age population. *Am J Med Genet.* 2005; 46(5): 486-91.
2. Lee KY, Choi SY, Bae JW, Kim S, Chung KW, Drayna D, et al. Molecular analysis of the *GJB2*, *GJB6* and *SLC26A4* genes in Korean deafness patients. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2008; 72(9): 1301-9.
3. Hilgert N, Smith RJH, Van Camp G. Forty-six genes causing nonsyndromic hearing impairment: which ones should be analyzed in DNA diagnostics? *Mutat Res/ Rev Muta Res.* 2009; 681(2): 189-96.
4. Hone SW, Smith RJH. Genetic screening for hearing loss. *Clin Otolaryngol Allied Sci.* 2003; 28(4): 285-90.
5. Smith RJH, Robin NH. Genetic testing for deafness *GJB2* and *SLC26A4* as causes of deafness. *J Commun Disord.* 2002; 35(4): 367-77.
6. Tabatabaiefar MA, Alasti F, Zohour MM, Shariati L, Farrokhi E, Farhud DD, et al. Genetic linkage analysis of 15 DFNB loci in a group of Iranian families with autosomal recessive hearing loss. *Iran J Public Health.* 2011; 40(2):34-48.

7. Zhao H, Pfeiffer R, Gail MH. Haplotype analysis in population genetics and association studies. *Pharmacogenomics*. 2003; 4(2): 171-8.
8. Rabionet R, Zelante L, Lopez-Bigas N, D'Agruma L, Melchionda S, Restagno G, et al. Molecular basis of childhood deafness resulting from mutations in the GJB2 (connexin 26) gene. *Hum Genet*. 2000; 106(1): 40-4.
9. Yazdanpanahi N, Chaleshtori MH, Tabatabaiefar MA, Noormohammadi Z, Farrokhi E, Najmabadi H, et al. Two novel *SLC26A4* mutations in Iranian families with autosomal recessive hearing loss. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2012; 76(6): 845-50.
10. Gibbs RA, Belmont JW, Hardenbol P, Willis TD, Yu F, Yang H, et al. The international HapMap project. *Nature*. 2003; 426(6968): 789-96.
11. Elahi E, Kumm J, Ronaghi M. Global genetic analysis. *J Biochem Mol Biol*. 2004; 37(1): 11-27.
12. Hildebrand CE, David C, Torney WRP, Wagner P. Informativeness of polymorphic DNA markers. *Los Alamos Sci*. 1992; 20(20): 100-2.
13. Mammalian Genotyping Service [database on the Internet]. Available from: <http://research.marshfieldclinic.org/genetics/home/index.asp>
14. Genethon Center [Database on the Internet]. Available from: <http://www.genethon.fr>
15. UniSTS Database [Database on the Internet]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unists>.
16. Raymond M, Rousset F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Hered*. 1995; 86 (3):248-249.
17. Weir BS. Genetic data analysis II: methods for discrete population genetic data. Sunderland: Sinauer associates, Inc; 1996.
18. Engels WR. Exact tests for Hardy-Weinberg proportions. *Genetics*. 2009; 183(76): 1431-41.
19. Park SDE. Trypanotolerance in West African cattle and the population genetic effects of selection [dissertation]. Dublin Univ; 2001.
20. Guo SW, Thompson EA. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*. 1992; 48(2): 361-72.
21. Balding DJ, Bishop M, Cannings C. Handbook of statistical genetics. 3rd ed. Wiley-Interscience; 2007.

Investigation of D7S496 marker characteristics in five Iranian ethnic groups for linkage analysis of autosomal recessive non syndromic hearing loss

Mojtabavi-Naeini M¹; Vallian-Boroujeni S²; Hashemzadeh-Chaleshtori M^{1*}

¹ Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran; ² Biology Dept., University of Isfahan, Isfahan, I.R. Iran.

Received: 10/March/2013 Accepted: 16/June/2013

Background and aims: The most important currently identifiable genetic cause of autosomal recessive non syndromic hearing loss (ARNSHL) after *GJB2* mutations are the *SLC26A4* gene mutations. In this investigation, the characteristics and informativeness of D7S496 CA repeat STR marker in *SLC26A4* gene region was examined in five ethnic groups of the Iranian population.

Methods: The locus were genotyped in 165 individuals of five different ethnic groups including Fars, Azari, Turkmen, Gilaki and Arabs using PCR followed by PAGE and fluorescent capillary electrophoresis. In this study, the results were analyzed by GeneMarker HID Human STR Identity software, GenePop program and Microsatellite Tools software.

Results: Analysis of the allelic frequency revealed the presence of 10 alleles for D7S496 marker in the Iranian population, which allele 137bp at the D7S496 locus with 41.52% allele frequency was the most frequent. The observed heterozygosity of all ethnic groups was approximately above 70%, which Turkmen ethnic had the highest heterozygosity among all. Finally, analysis of PIC value represents D7S496 marker as a highly informative marker in Iranian population (PIC value above 0.7).

Conclusion: Our data introduce D7S496 as a highly informative marker in diagnosis of *SLC26A4* based ARNSHL by Linkage analysis.

Keywords: Autosomal recessive non syndromic hearing loss; Short Tandem Repeat; *SLC26A4*; Iranian population.

Cite this article as: Mojtabavi-Naeini M; Vallian-Boroujeni S; Hashemzadeh-Chaleshtori M. Investigation of D7S496 marker characteristics in five Iranian ethnic groups for linkage analysis of autosomal recessive non syndromic hearing loss. J Shahrekord Univ Med Sci. 2014; 15(Suppl): 68-77.

*Corresponding author:

Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Rahmatieh, Shahrekord, I.R. Iran. Tel: 00983813346692, E-mail: mchalesh@yahoo.com